ICS 07.080
CCS A 40

中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z XXXXX—XXXXISO/TS 20224-9:2022

、

动物源性制品中源性成分检测 实时荧光定量 PCR 法 第 9 部分：鹅 DNA 检测方法

Detection of common animal-derived components in livestock and poultry
Real-time PCR — Part 9: Goose DNA detection method

(ISO/TS 20224-9：2022，IDT)

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

目　　次

前言 III
引言 IV
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　原理 1
5　试剂耗材 2
5.1　通则 2
5.2　PCR 试剂 2
5.2.1　PCR 预混液 2
5.2.2　引物和探针 2
6　仪器和设备 2
6.1　实时荧光 PCR 仪 2
7　方法 2
7.1　样品制备 3
7.2　DNA 提取 3
7.3　PCR 设置 3
7.3.1　反应物混合 3
7.3.2　PCR 对照 3
7.3.3　实时 PCR 设置 3
7.4　反应程序 3
8　质控要求与结果表达 4
8.1　质控要求 4
8.2　结果表达 4
9　验证过程和性能指标 4
9.1　概述 4
9.2　稳健性 4
9.3　再现性 4
9.4　灵敏度 5
9.5　特异性 7
10　检测报告 9
附录 A （资料性 ） 基于 BlastN+2.12.0 软件对 GenBank RefSeq 基因组（RefSeq_genomes）和全基因组鸟枪法 Contigs（wgs）测序组装的比对 10
A.1　查询 10
A.2　说明 10
A.3　基因组比对 11

参考文献 16

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件等同采用ISO/TS　20224-9:2022《Molecular biomarker analysis — Dectection of annimal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 9: Goose DNA detection method》，文件类型由ISO的技术规范调整为我国的国家标准。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

食品和饲料中肉类的肉类的掺杂掺假行为对公共安全和商业活动均构成威胁。掺假可能会影响遵循民族饮食习惯的人群，还会对经济发展和社会稳定造成影响。本文件提供了一种实时荧光定量PCR（real-time PCR）分析方法，利用食品成分中的核酸来鉴定肉类动物物种。

食品中的动物源性生物材料在实验室中通过以下连续（或同步）步骤进行检测和鉴别：试样样品的制备、核酸提取与纯化、PCR扩增及结果判读。本文件提供了关于PCR扩增的指导，旨在检测家养商业品种的中国家鹅（*Anser cygnoides* domesticus）和欧洲家鹅（*Anser anser* domesticus），并对结果进行判读。预计该方法会与雁形目（Anseriformes）中的其他物种存在交叉反应，包括：粉脚雁（*Anser brachyrhynchus*）、斑头雁（*Anser indicus*）、加拿大黑雁（*Branta canadensis*）、黑天鹅（*Cygnus atratus*）、黑嘴天鹅（*Cygnus buccinator*）、大天鹅（*Cygnus cygnus*）、疣鼻天鹅（*Cygnus olor*）、棉凫（*Nettapus auritus*）、硬尾鸭（*Oxyura jamaicensis*）和澳洲麻鸭（*Stictonetta naevosa*）。本文件可用于区分家鹅与最常见的鹅肝掺假物——家鸡、家鸭和火鸡。此外，本文件还可用于区分家鹅与其他高端家禽肉类（如鹌鹑、鸽子、野鸡）。

ISO 20224 系列由一系列技术规范组成。未来确立的新物种 DNA 检测方法将作为独立部分予以补充。

动物源性制品中源性成分检测　实时荧光定量 PCR 法 第 9 部分：鹅 DNA 检测方法

1　范围

本文件规定了动物源性产品中鹅特异性 DNA 的实时荧光定量PCR(real-time PCR)检测方法。

本文件适用于中国家鹅(*Anser cygnoides* domesticus)和欧洲家鹅(*Anser anser* domesticus)来源的鹅源性成分检测。

本文件存在与粉脚雁(*Anser brachyrhynchus*)、斑头雁(*Anser indicus*)、加拿大黑雁(*Branta canadensis*)、黑天鹅(*Cygnus atratus*)、黑嘴天鹅(*Cygnus buccinator*)、大天鹅(*Cygnus cygnus*)、疣鼻天鹅(*Cygnus olor*)、棉凫(*Nettapus auritus*)、硬尾鸭(*Oxyura jamaicensis*)及澳洲麻鸭(*Stictonetta naevosa*)的交叉反应。

本文件可用于区分中国家鹅(*Anser cygnoides* domesticus) 和欧洲家鹅(*Anser Anser* domestics)与最常见的鹅肝掺假品-家鸡、鸭和火鸡。同时可用于区分家鹅与其他高端家禽肉（鹌鹑、鸽子、野鸡）。

本文件的目标序列为中国家鹅（*Anser cygnoides*）四川白鹅品系（SCWG-2014 品系）的一段部分片段，位于未定位基因组支架 GooseV1.0 scaffold320上（GenBank登录号NW_025927981.1），该序列在单倍体基因组中以单拷贝形式存在。方法检测限为5拷贝/反应，在此浓度($LOD_{95\%}$)下的置信度≥95%。

2　规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO 16577 分子标志物分析 农业和食品生产中分子标志物分析方法词汇(Molecular biomarker analysis —Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production)

ISO 20813 分子标志物分析 食品和食品产品中动物物种检测方法 通用要求和定义(Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) — General requirements and definitions)

ISO 21571 食品-转基因生物及其产品检测的分析方法-核酸提取 （ Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction)

ISO 24276 食品-转基因生物及其产品检测的分析方法-一般要求和定义 (Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions)

3　术语和定义

ISO 16577界定的术语和定义适用于本文件。

ISO和IEC在以下网址获取标准化术语数据库。

——ISO在线浏览平台：https://www.iso.org/obp

——IEC电子百科全书：可在https://www.electropedia.org

4　原理

按照 ISO 21571:2005，附录 A.1 规定的方法提取试样 DNA。DNA 检测包括两部分：

——通过测定真核生物（如18S rRNA基因），哺乳动物、家禽（如肌肉生长抑制素基因）的PCR方法，验证提取得到的DNA质量；

——通过实时荧光定量PCR(real-time PCR)，检测中国家鹅（*Anser cygnoides*）单拷贝物种特异性DNA序列。该序列源自四川白鹅品种（分离株 SCWG-2014），位于 GooseV1.0 基因组组装版本的未定位支架 scaffold320 上（GenBank 登录号：NW_025927981.1）。

注：真核核糖体18S RNA（18S rRNA）基因在细胞中的拷贝数从几百到几千不等，而鹅基因组中的特定靶序列和哺乳动物、家禽基因组中的肌肉生长抑制素基因是单拷贝。基因组中特定靶序列的拷贝数通过全基因组的生物信息学分析（见附录A）和数字PCR来进行绝对定量。

5 试剂耗材

5.1 通则

本文件所用试剂及实验用水均应符合分子生物学级别要求。特殊说明的试剂应经高压灭菌制备。实验应使用无粉手套。建议采用带滤芯移液器吸头，防止交叉污染。

5.2 PCR 试剂

5.2.1 PCR 预混液

实时荧光PCR预混液通常包含耐热DNA聚合酶、dNTPs、MgCl2、KCl及缓冲液，以即用型浓缩混合液形式提供。

注：可使用符合要求的商品化实时荧光 PCR 预混液。

5.2.2 引物和探针

检测所用的引物和探针序列见表1。

表 1 引物和探针序列

检测基因	引物和探针序列	PCR 中的终浓度
中国家鹅（*Anser cygnoides*）四川白鹅品种分离株 SCWG-2014 中位于未定位基因组支架上的特异性序列（GenBank 登录号：NW_025927981.1）[a]		
鹅-121bp-F	5′-ACGAGGATAGGTTGTGACAGC-3′	400 nmol/L
鹅-121bp-R	5′-GAATCTCTGTGTCGTCTTCTCTATATG-3′	400 nmol/L
鹅-121bp-P	5′-[FAM]-ACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGC-[TAMRA][b]-3′	200 nmol/L

[a] PCR 产物=113884-ACGAGGATAG GTTGTGACAG CTGACTCTGT TCAGCCTTGC GAAGACCTTA TGCTGTCTAC AATTACCTAA TTGGAGGATA TAGAATTATA GAATCATATA GAGAAGACGA CACAGAGATT C -114004-NW_025927981.1

[b] FAM:6-羧基荧光素，TAMRA:6-羧基四甲基罗丹明

鹅源121bp-F 引物对应 NW_025927981.1（中国家鹅未定位基因组支架）的 113 884 – 113 904 bp；
鹅源121bp-R 引物对应 113 978 – 114 404bp；
鹅源121bp-P 探针对应 113 907 – 113 936bp。
若能达到相同或更优检测效果，可采用等效报告荧光染料和/或淬灭荧光染料组合。

6 仪器和设备

仪器和设备应符合ISO 20813。除常规的实验室设备外，还需要以下设备：

6.1 实时荧光定量 PCR 仪

需配备能进行DNA扩增并执行温度-时间循环的PCR设备。该设备应具备：
——在特定波长激发荧光分子的能力。
——检测所用荧光标记物（TaqMan 检测体系）荧光信号的能力。

7 方法

7.1 样品制备

选取具有代表性且均一的样品进行DNA提取，样品制备应满足ISO 21571和ISO 20813中所述的一般要求和具体方法。

7.2 DNA 提取

样品的DNA提取应满足ISO 21571中规定的一般要求和方法。推荐ISO 21571:2005附录A中描述的DNA提取方法。

7.3 PCR 设置

7.3.1 反应物混合

该方法总体系为25 μL。反应体系配置如表2所示。试剂在室温下完全解冻，颠倒混匀后瞬时离心。所制备的PCR试剂混合物应包含除样品DNA之外的所有成分，且所制备的PCR试剂混合物的所需总量取决于要进行的反应次数，并至少要额外准备一份反应量，用作移液过程的损失。样品和对照的数量应符合ISO 20813。按照以下步骤进行PCR检测：

a) 将反应液混合后瞬时离心，按照每管 20 μL 分装于 PCR 仪适用的 PCR 管中；
b) 分别取 5 μL 的 DNA 样品加入到分装好的 PCR 管中，阴性对照反应管中加入 5 μL 阴性对照，阳性对照反应管中加入 5 μL 相应模板，空白对照反应管中加入 5 μL 水；
c) 混匀并瞬时离心。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

总反应体积	25 μL
样品 DNA（20 ng/μl 至 200 ng/μl）或对照	5 μL
2×PCR 预混液[a]	12.5 μL
引物 鹅-121bp-F（浓度 10 μmol/L）和 鹅-121bp-R（浓度 10 μmol/L）	各 1.0 μL
探针鹅-121bp-P，浓度=10 μmol/L	0.5 μL
补水至	25 μL
[a] 实验中使用了一种即用型优化的 2×PCR 预混液（Master Mix），其中包含除模板和引物外的所有成分。2×PCR 预混液包含耐热 DNA 聚合酶、dNTP 与 dUTP 和尿嘧啶 UDG 的混合物，以尽量减少携带的 PCR 污染，并添加了基于 ROX 染料的被动内参。如果使用其他等效产品能获得相同或更佳的结果，亦可使用。如有必要，可对试剂用量及温度 – 时间程序进行调整。	

7.3.2 PCR 对照

7.3.2.1 概述

PCR对照应符合ISO 24276和ISO 20813的规定。

7.3.2.2 PCR 对照

应使用内参照（即真核生物的18SrRNA基因、哺乳动物和家禽的肌肉生长抑制素基因）的DNA进行PCR检测，以测试核酸的可扩增性并提供对照以排除假阴性结果。

7.3.3 实时 PCR 设置

将配制好的反应管转移到实时荧光定量PCR仪上，摆放反应管时应避免边际效应。

7.4 反应程序

PCR循环条件设置如表3所示。在验证研究中使用时，应验证不同反应条件和实时PCR循环的使用情况，初始变性的时间取决于所使用的预混液。

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	参数	温度	时间	荧光测量	循环数
1	UNG酶活化[a]	50℃	2min	否	1

步骤	参数		温度	时间	荧光测量	循环数
2	预变性		95℃	10min	否	1
3	扩增	变性	95℃	15s	否	45
		退火和延伸	60℃	60s	是	
[a] 如果预混液中包含 UDG 酶，则 UNG（尿嘧啶-N-糖苷酶）必须激活，如果预混液不包含 UDG-糖基酶，则 UNG（尿嘧啶-N-糖苷酶）可选是否激活操作。						

8 质控要求与结果表达

8.1 质控要求

鉴定PCR产物应使用与实时荧光定量PCR仪配套的数据分析程序。扩增结果因所使用仪器型号的不同而存在差异。在没有可检测的PCR产物（如阴性对照）的情况下，结果应表示为“未检出”、“无扩增”或进行的最大反应循环次数。如果样品（如阳性对照）中的DNA靶序列发生扩增，则应观察到S形扩增曲线，应计算扩增曲线和荧光阈值交叉点处的循环数[循环阈值（Ct）或定量循环（Cq）]。

如果由于非典型荧光测量数据导致自动判读不能提供有效结果，则需要在软件分析数据之前手动设置基线和阈值。在这种情况下，应遵循分析软件提供的设备特定说明。

8.2 结果表达

如果满足以下条件，则认为目标序列已检测到：

——结果呈现 S 形扩增曲线并且可以计算 Ct 值或 Cq 值；

——未添加 DNA 的 PCR 对照反应（PCR 试剂对照、提取空白对照）无扩增；

——扩增对照（阳性 DNA 靶标对照、PCR 抑制对照）产生预期的扩增和 Ct 值（或 Cq 值）。

痕量检测被定义为Ct值大于目标$LOD_{95\%}$所设定值的PCR结果。如果同一样品的不同提取物的痕量检测与阳性/阴性结果互相矛盾，则应重新检测样品。应从已均质的实验室样品中制备至少两份新提取物。新提取物应至少进行20次PCR重复（例如，两份提取的DNA进行10次PCR重复，三份提取的DNA进行7次PCR重复）。如果≥95%的新提取物PCR结果为阳性，则应将目标序列视为“检出”。如果<95%的新提取物PCR结果为阳性，则应将目标序列视为“未检出”。

9 验证过程和性能指标

9.1 概述

验证过程分为两部分：

a) 内部验证；

d) 实验室间验证。

9.2 稳健性

通过改变以下因素的反应条件，证实该方法在实验室间验证试验中的稳健性：

a) 实时 PCR 仪器（例如 ABI 7500、BioRad CFX96、ABI 7900 HT Fast、Eppendorf Realplex 4；

注：所列仪器均为市售适用型号示例。此信息仅为方便本标准的使用者，并不代表ISO对这些产品的认可。

b) 反应体系 ：19 µL 或 21 µL PCR 试剂混合物加 5 µL 对照 DNA（20 ng/µL 至 200 ng/µL）；

c) 退火温度：59℃和 61℃；

d) 引物或探针浓度：均降低 30%。

针对每个反应条件，PCR反应均设置三重复 ：每重复包含20拷贝数阳性靶序列及100拷贝数阴性非靶序列（作为阴性对照）。在所有变更条件下，阳性对照与阴性对照的方法性能均保持符合要求。

9.3 再现性

本文件的再现性通过一项由上海海关动植物与食品检验检疫技术中心组织的实验室间验证。实验依据国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)协议及德国联邦消费者保护与食品安全局(BVL)指南开展，共

12家实验室参与。实验室间验证中，参与者共接收了12份DNA样本用于假阳性率与假阴性率评估。所有样本采用随机盲样编码，且包含6份重复样本。具体样本组成如下：

——鹅源性 DNA 样本组 （6 份），浓度 10 拷贝/ μL （ copies/ μL)；

——牛源性 DNA 样本组 （6 份），浓度 10 拷贝/ μL （ copies/ μL)。

目标序列的拷贝数通过本研究的实时荧光定量PCR(real-time PCR)及含目标序列的质粒DNA梯度稀释法测定。质粒DNA浓度(copies/ μL)通过数字PCR（digital PCR）进行绝对定量。

参与者从验证组织方获取PCR预混液和寡核苷酸（引物和探针），以进行PCR实验。

鹅和牛基因组DNA分别从鹅肉和牛肉中提取，然后用0.2×TE缓冲液分别调整其标称浓度，鹅DNA为10拷贝/ μL，牛DNA为20拷贝/ μL。

本验证旨在评估检测方法的假阳性和假阴性率。各参与实验室依据表2与表3提供的实验步骤与反应条件，采用单次PCR检测（加样量5 μL）对每个DNA样本进行分析。验证结果汇总于表4。

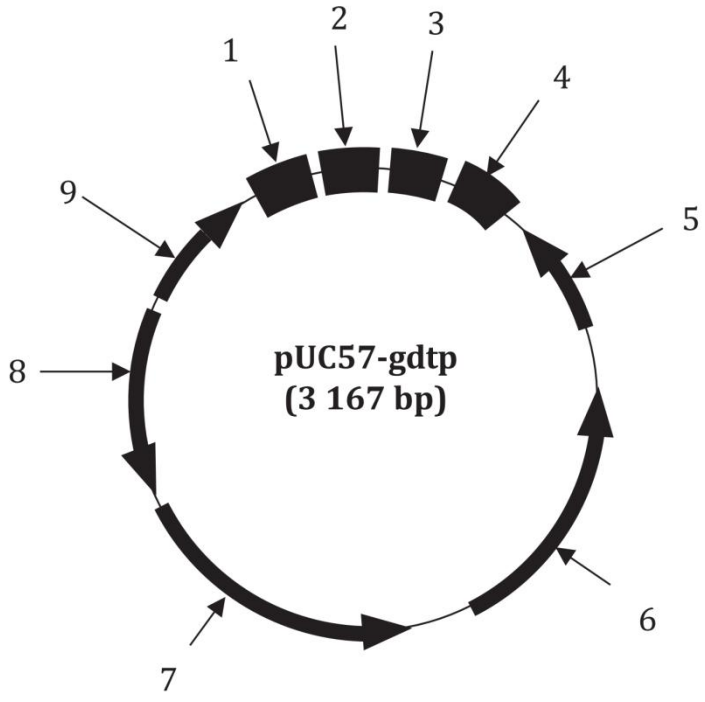
表 4　协同实验结果

实验室数量	12
提交结果的实验室数量	12
每个实验室的样本数量	12
接受的结果数量	144
已接受的含有鹅材料的样品数量	72
不含鹅肉材料的已接受样品数量	72
假阳性结果	0
假阳性结果(%)	0
假阴性结果	1
假阴性结果(%)	1.4

9.4　灵敏度

该方法的检测限（$LOD_{95\%}$）为5个DNA拷贝数。鹅源性成分检测方法的协同试验与鸭、火鸡和鸽子源性成分检测方法的协同试验同步开展。鹅、鸭、火鸡和鸽子的DNA靶序列合成后克隆到pUC57载体中（长度2710bp，GenBank/EMBL登录号Y14837）。

对构建的质粒pUC57-gdtp（长3167bp）进行测序，确认只插入了单拷贝的鹅、鸭、火鸡和鸽子DNA靶序列的（见图1）。插入序列中未发现缺失或突变（见图2）。PCR检测方法的靶序列已明确标注。



注：

1—nt 1-121=鹅扩增片段(121 bp)
2—nt122~226=鸭扩增片段(105 bp)
3—nt 227~344=火鸡扩增片段(118 bp)
4—nt 345~457=鸽子扩增片段(113 bp)
5—M13反向启动子
6—ColE1复制起点
7—β-内酰胺酶基因（氨苄西林耐药基因）
8—氨苄青霉素抗性基因启动子
9—M13正向启动子

图 1　多靶点 DNA 质粒结构示意图

注：

单粗实线下划线　　nt 1-121=鹅扩增片段(121bp)
双下划线 nt 122-226=鸭扩增片段(105bp)
虚线下划线 nt 227-344=火鸡扩增片段(118 bp)
点线下划线 nt 345-457=鸽子扩增片段(113 bp)

图 2　质粒 pUC57 中核苷酸（nt）的完整序列和插入注释

在本次验证中，每位参与者均获得了一种含有pUC57质粒DNA的溶液体系。该溶液中目标序列的拷贝数经校准至1000拷贝/ μL（见图1和图2），并以20ng/ μL超声处理的鲑鱼精DNA作为载体溶液进行配制。。在分装前，该浓度通过数字PCR（QX100液滴数字 PCR系统（注））完成定量检测。参与协作的12家实验室使用含20 ng/ μL超声破碎鲑鱼精DNA的0.2×TE缓冲液，制备了浓度梯度为0.02拷贝/ μL至4拷贝/ μL的系列稀释液。

每位参与者对每个浓度梯度进行了六次重复测定。在72次测试中，72次测试的每个PCR反应均达到5个拷贝，结果呈阳性（见表5）。

检测概率(POD)指在给定靶序列拷贝数条件下上发生PCR扩增的概率（见ISO/TS 16393）。通过整合所有实验室及稀释梯度产生的定性检测数据（见表5），按照文献[3]所述方法确定该检测方法的POD值为0.95（见表6）。测得标准偏差为0.30，95%检测限为3.1拷贝；这两个参数分别显著低于规定的最大值1 μL和20 μL 。

注：本产品由Bio-Rad GmbH公司提供。此信息仅为使用本文件的相关方而提供，并不表示ISO对所述产品的认可。若可以证明其他等效产品可获得相同的结果，亦可使用。

表 5　检测限（$LOD_{95\%}$）的协同实验结果

每次 PCR 反应鹅基因组 Scaffold 中特定 DNA 序列的拷贝数（标称）	在 72 次结果中阳性结果数量（Ct＜45）
20	72
10	72

每次 PCR 反应鹅基因组 Scaffold 中特定 DNA 序列的拷贝数（标称）	在 72 次结果中阳性结果数量（Ct＜45）
5	72
2	68
1	57
0.5	38
0.1	16

表 6　检测概率（POD）的协同实验结果

参数		鹅基因组 Scaffold 中的特定 DNA 序列
实验室数量		12
每个稀释水平的PCR重复次数		6
POD曲线	各实验室间平均检测概率（ LPOD ）	0.83
	LPOD的95%置信区间	0.78至0.87
	相对于理想POD曲线的斜率b（ b=1 ）	1.13
	实验室标准偏差， σ_L	0.9
$LOD_{95\%}$（拷贝数）	实验室理论中值	3.1

9.5　特异性

选取源自中国家鹅(*Anser cygnoides*)四川白鹅品种分离株 SCWG-2014位于 GooseV1.0 基因组组装版本未定位支架 scaffold320 上的一段代表性序列(GenBank 登录号：NW_025927981.1)作为 PCR 靶标。随后，利用引物与探针选择及优化软件，对引物和探针进行了设计与优化。

利用 BLASTN 程序，分析了针对中国家鹅(*Anser cygnoides* domesticus)未定位基因组支架序列所设计的引物和探针的理论特异性（即与其他物种的同源性）。用作查询序列的 121 bp 片段源自 NCBI 登录号 NW_025927981.1（核苷酸位置：113 884 – 114 004）。相似性搜索结果见附录 A。结果显示，该序列与其他属及基因均无同源性。

表7所列检测体系基于不同物种的DNA样本（约200 ng/PCR）建立，其理论预期值通过NCBI公共数据库检索确定。

分别合成121 bp的序列（对应于粉脚雁*Anser brachyrhynchus*，登录号NXHY01000202.1；斑头雁*Anser indicus*，登录号VDDG01000056.1；加拿大黑雁*Branta canadensis*，登录号SNRU01005576.1；黑天鹅*Cygnus atratus*，登录号JABXOC010000147.1；黑嘴天鹅*Cygnus buccinator*，登录号JAHMHU010001625.1；大天鹅*Cygnus cygnus*，登录号BMBB01013197.1；疣鼻天鹅*Cygnus olor*，登录号NC_049169.1；棉凫*Nettapus auratus*，登录号JAACYP010002576.1）、119 bp的序列（对应于澳洲麻鸭*Stictonetta naevosa*，登录号JAACYO010005739.1）和127 bp的序列（对应于硬尾鸭*Oxyura jamaicensis*，登录号NW_023310710.1，并克隆到pUC57载体中，用于在没有可用生物样本的情况下进行实验检测。预期可实现雁形目（Anseriformes）中粉脚雁(*Anser brachyrhynchus*)、斑头雁(*Anser indicus*)、加拿大黑雁(*Branta canadensis*)、黑天鹅(*Cygnus atratus*)、黑嘴天鹅(*Cygnus buccinator*)、大天鹅(Cygnus cygnus)、疣鼻天鹅(Cygnus olor)、棉凫(Nettapus auritus)、澳洲麻鸭(Stictonetta naevosa)及硬尾鸭(Oxyura jamaicensis)的交叉检测。

包容性和特异性针对九个品种进行了测试，包括：中国家鹅（*Anser cygnoides* domesticus）的浙东白鹅、四川白鹅、皖西白鹅、马岗鹅、豁眼鹅、狮头鹅，以及欧洲家鹅（*Anser anser* domesticus）的卡洛斯鹅（欧洲）、罗马白鹅（意大利）和霍尔托巴吉鹅（匈牙利）。

当靶DNA含量约为100拷贝数时，所有品种样品均被检出，并呈现出预期的阳性信号及扩增曲线。

表 7　目标鹅基因组序列检测方法的特异性

物种测试	理论预期	实验验证

物种测试		理论预期	实验验证
雁形目	绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）	N	N
	斑嘴鸭（*Anas zonorhyncha*）	N	N
	欧洲家鹅（*Anser anser domesticus*）	Pos	Pos
	粉脚雁（*Anser brachyrhynchus*）	Pos	Pos[a]
	中国家鹅（*Anser cygnoides domesticus*）	Pos	Pos
	斑头雁（*Anser indicus*）	Pos	Pos[b]
	加拿大黑雁（*Branta canadensis*）	Pos	Pos[c]
	番鸭（*Cairina moschata*）	N	N
	黑天鹅（*Cygnus atratus*）	Pos	Pos
	黑嘴天鹅（*Cygnus buccinator*）	Pos	Pos[d]
	大天鹅（*Cygnus cygnus*）	Pos	Pos[e]
	疣鼻天鹅（*Cygnus olor*）	Pos	Pos[f]
	棉凫（*Nettapus auritus*）	Pos	Pos[g]
	硬尾鸭（*Oxyura jamaicensis*）	Pos	Pos[h]
	澳洲麻鸭（*Stictonetta naevosa*）	Pos	Pos[i]
其他动物	火鸡（*Meleagris gallopavo*）	N	N
	家鸡（*Gallus gallus*）	N	N
	雉鸡（*Phasianus colchicus*）	N	N
	鹌鹑（*Coturnix coturnix*）	N	N
	鸵鸟（*Struthio camelus*）	N	N
	野牛（*Bison Bison*）	N	N
	骆驼（*Camelus bactrianus*）	N	N
	鲤鱼（*Cyprinus carpio*）	N	N
	猫（*Felis catus*）	N	N
	牛（*Bos taurus*）	N	N
	狗（*Canis familiaris*）	N	N
	驴（*Equus asinus*）	N	N
	马鹿（*Cervus canadensis*）	N	N
	山羊（*Capra hircus*）	N	N
	金鱼（*Carassius auratus*）	N	N
	马（*Equus caballus*）	N	N
	印度瘤牛（*Bos indicus*）	N	N
	小鼠（*Mus musculus*）	N	N
	骡子（*Equus caballus* × *asinus*）	N	N
	猪（*Sus scrofa domesticus*）	N	N
	鸽子（*Columba livia*）	N	N
	大鼠（*Rattus norvegicus*）	N	N
	恒河猴（*Macaca mulatta*）	N	N
	绵羊（*Ovis aries*）	N	N
	鳟鱼（*Onchorhynchus mykiss*）	N	N
	水牛（*Bubalus bubalis*）	N	N
	牦牛（Bos mutus）	N	N
人类	人类（*Homo sapiens*）	N	N
植物	苜蓿（*Medicago sativa*）	N	N
	玉米（*Zea mays*）	N	N
	油菜（*Brassica rapa*）	N	N
	水稻（*Oryza sativa*）	N	N
	高粱（*Sorghum bicolor*）	N	N
	大豆（*Glycine max*）	N	N
	小麦（*Triticum aestivum*）	N	N
注：Pos：阳性；N：阴性			
[a][b][c][d][e][f][g] 代替粉脚雁（Anser brachyrhynchus）、斑头雁（Anser indicus）、加拿大雁（Branta canadensis）、号手天鹅（Cygnus buccinator）、大天鹅（Cygnus cygnus）、疣鼻天鹅（Cygnus olor）、棉凫（Nettapus auritus）生物样本用于实验检测的121 bp靶序列，经BLASTN比对具有高度同源性，已将其克隆到质粒pUC57			

物种测试	理论预期	实验验证
中。登录号分别为：NXHY01000202.1（730 151 bp－730 271 bp），VDDG0100056.1（4 845 310 bp－4 845 190 bp），SNRU01005576.1（35 532 bp－35 652 bp），JAHMHU010001625.1（12 009 bp－12 129 bp）、BMBB01013197.1（22 302 bp－22 422 bp）、NC_049169.1（171 257 862 bp－171 257 982 bp）和JAAC-YP010002576.1（922 bp至1 042 bp）。 [h] 代替硬尾鸭（Oxyura jamaicensis）生物样本用于实验检测的127 bp靶序列（登录号：NW_023310710.1，763 bp－889 bp），经BLASTN比对具有高度同源性，已将其克隆到质粒pUC57中。 [i] 代替澳洲麻鸭（Stictonetta naevosa）生物样本用于实验检测的119 bp靶序列（登录号：JAACYO010005739.1，770 bp－888 bp），经BLASTN比对具有高度同源性，已将其克隆到质粒pUC57中。		

10 检测报告

检测报告应按照ISO 20813和其他适用标准（如ISO 24276）的要求编制

附 录 A
（资料性）
基于BlastN+2.12.0软件对GenBank RefSeq基因组(RefSeq_genomes)和全基因组鸟枪法 Contigs(wgs)测序组装的比对

A.1 查询

A.1.1 查询ID：NW_025927981.1（113 884–114 004 bp）。

A.1.2 产品描述：中国家鹅（*Anser cygnoides*）分离株SCWG-2014（品种四川白鹅）的未定位基因组支架（GooseV1.0 scaffold320）。

A.1.3 分子类型：核酸。

A.1.4 查询长度：121 bp。

A.2 说明

见表A.1。

表A.1 说明

描述	最高得分	总分	查询覆盖率%	e值	一致性	登录号	登录号长度	标准数据库	物种分类
中国家鹅（*Anser cygnoides*）分离株 SCWG-2014（品种四川白鹅）的未定位基因组支架（GooseV1.0 scaffold320）	224	224	100	2e-55	100.00	NW_025927981.1	611258	GenBank 参考序列基因组（refseq_genomes）	雁形目（分类ID:8826）
斑头雁（*Anser indicus*）心脏组织样本的基因组支架_1388，全基因组鸟枪序列	224	224	100	3e-55	100.00	VDDG01000056.1	11358879	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）
粉脚雁（*Anser brachyrhynchus*）PFG001 分离株，scaffold_201，全基因组鸟枪法测序	224	224	100	3e-55	100.00	NXHY01000202.1	1368934	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）
加拿大黑雁（*Branta canaden*）SJ_97 分离株，contig25_131，全基因组鸟枪序列	219	219	100	1e-53	99.17	SNRU01005576.1	59448	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）
黑嘴天鹅（*Cygnus buccinator*）WWS_Y101 分离株，seq_1625 全	213	213	100	6e-52	98.35	JAHM-HU010001625.1	30693	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）

描述	最高得分	总分	查询覆盖率%	e 值	一致性	登录号	登录号长度	标准数据库	物种分类
基因组鸟枪序列									
黑天鹅（*Cygnus atratus*）AKBS03品系，澳大利亚昆士兰生态型，未定位基因组支架（Cygnus_atratus_primary_v1.0 000174F）	213	213	100	5e-52	98.35	NW_02336758.1	654044	GenBank 参考序列基因组（refseq_genomes）	雁形目（分类ID:8826）
大天鹅（Cygnus cygnus）基因组DNA，Cycy_13197，全基因组鸟枪序列	213	213	100	6e-52	98.35	BMBB01013197.1	23417	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）
疣鼻天鹅（*Cygnus olor*）bCygOlo1 分离株，1 号染色体，bCygOlo1.pri.v2 版本	207	207	100	2e-50	97.52	NC_049169.1	20952193	GenBank 参考序列基因组（refseq_genomes）	雁形目（分类ID:8826）
斑鸭（*Stictonetta naevosa*，俗称花斑鸭），SHBPF4130 SN47.24 分离株，全基因组鸟枪法测序序列	180	180	98	6e-42	94.12	JAACYO010005739.1	33151	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）
非洲棉凫（*Nettapus auritus*，即非洲侏儒雁）SHBP007 NA37.712 分离株，全基因组鸟枪法测序序列	171	171	98	3e-39	92.44	JAACYP010002576.1	35822	全基因组鸟枪法叠连群（wgs）	雁形目（分类ID:8826）
美洲硬尾鸭（*Oxyura jamaicensis*，即红头鸭）SHBP4307 分离株，未定位基因组支架，编号 BPBGC_Ojam_1.0 oxyUn_random_OJ71826	154	154	98	3e-34	89.60	NW_023310710.1	10665	GenBank 参考序列基因组（refseq_genomes）	雁形目（分类ID:8826）

A.3 基因组比对

中国家鹅（*Anser cygnoides*）分离株 SCWG-2014（品种四川白鹅）的未定位基因组支架（GooseV1.0 scaffold320），序列号： NW_025927981.1。

长度：1496546　　比对次数：1　　范围 1:113884 到 114 004

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
224 bits（121）	2e-55	121/121(100 %)	0/121(0 %)	正/正

```
Query  1       ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  113884  ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  113943

Query  61      AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  113944  AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  114003

Query  121     C 121
               |
Sbjct  114004  C 114004
```

斑头雁（*Anser indicus*）心脏组织样本的基因组支架_1388，全基因组鸟枪序列，序列号VDDG01000056.1。

长度：11358879　　比对次数：1　　范围 1:4845310 到 4845190

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
224bits（121）	3e-55	121/121(100 %)	0/121(0 %)	正/负

```
Query  1        ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4845310  ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  4845251

Query  61       AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4845250  AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  4845191

Query  121      C 121
                |
Sbjct  4845190  C 4845190
```

粉脚雁（*Anser brachyrhynchus*）PFG001 分离株，scaffold_201，全基因组鸟枪法测序，序列号：NXHY01000202.1。

长度：1368934　　比对次数：1　　范围 1:730151 到 730271

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
224bits（121）	3e-55	121/121(100 %)	0/121(0 %)	正/正

```
Query  1       ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  730151  ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  730210

Query  61      AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  730211  AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  730270

Query  121     C 121
               |
Sbjct  730271  C 730271
```

加拿大黑雁（Branta canaden）SJ_97分离株，contig25_131，全基因组鸟枪序列，序列号：SNRU01005576.1。

长度：59448　　比对次数：1　　范围 1: 35532 到 35652

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
219 bits（118）	3e-53	120/121(99 %)	0/121(0 %)	正/负

```
Query  1         ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35652     ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  35593

Query  61        AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
                 | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  35592     AGTTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  35533

Query  121       C 121
                  |
Sbjct  35532      C 35532
```

号手天鹅（*Cygnus buccinator*）WWS_Y101 分离株，seq_1625全基因组鸟枪序列，序列号：JAHMHU010001625.1。

长度：30693　　比对次数：1　　范围 1:12009 到 12129

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
213 bits（115）	5e-52	119/121(98 %)	0/121(0 %)	正/负

```
Query  1         ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  12129     ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGTGAAGACCTTATGCTGTCTAC  12070

Query  61        AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
                 | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12069     AGTTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  12010

Query  121       C 121
                  |
Sbjct  12009      C 12009
```

黑天鹅（*Cygnus atratus*）AKBS03 品系，澳大利亚昆士兰生态型，未定位基因组支架（Cygnus_atratus_primary_v1.0 000174F），序列号：NW_023336758.1

长度：654044　　比对次数：1　　范围 1:620624 到 620744

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
213 bits（115）	3e-52	119/121(98 %)	0/121(0 %)	正/正

```
Query  1         ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  620624    ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGTGAAGACCTTATGCTGTCTAC  620683

Query  61        AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
                 | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  620684    AGTTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  620743

Query  121       C 121
                  |
Sbjct  620744     C 620744
```

大天鹅（*Cygnus cygnus*）基因组DNA，Cycy_13197，全基因组鸟枪序列，序列号：BMBB01013197.1。

长度：23417　　比对次数：1　　范围 1:22302 到 22422

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
213 bits（115）	5e-52	119/121(98 %)	0/121(0 %)	正/负

```
Query  1       ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  22422   ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGTGAAGACCTTATGCTGTCTAC  22363

Query  61      AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
               | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  22362   AGTTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  22303
 Query  121    C 121
               |
Sbjct  22302   C 22302
```

疣鼻天鹅（*Cygnus olor*）bCygOlo1 分离株，1 号染色体，bCygOlo1.pri.v2 版本，序列编号 NC_049169.1。

长度：23417　　比对次数：1　　范围 1:22302 到 22422

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
213 bits（115）	5e-52	119/121(98 %)	0/121(0 %)	正/负

```
Query  1         ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTAC  60
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  171257862 ACGAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGTGAAGACCTTATGCTGTCTAC  171257921

Query  61        AATTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATT  120
                 | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  171257922 AGTTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGATGACACAGAGATT  171257981

Query  121       C 121
                 |
Sbjct  171257982 C 171257982
```

斑鸭（*Stictonetta naevosa*，俗称花斑鸭），SHBPF4130 SN47.24 分离株，全基因组鸟枪法测序序列，序列号：JAACYO010005739.1。

长度：33151　　比对次数：1　　范围 1:772 到 888

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
180 bits（97）	6e-42	112/121(94 %)	2/121(1 %)	正/正

```
Query  3     GAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTACAA  62
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||
Sbjct  772   GAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCAAAGACCTTGTGCTGTCTACAG  831

Query  63    TTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATTC  121
             |||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||  ||||||||||
Sbjct  832   TTACCTAATTGGAGGATATAGAATCACAGAATCATATAGAGAAGACG--ACAGAGATTC  888
```

非洲棉凫（*Nettapus auritus*，即非洲侏儒雁）SHBP007 NA37.712 分离株，全基因组鸟枪法测序序列，序列号：JAACYP010002576.1。

长度：35822　　比对次数：1　　范围 1:924 到 1042

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
171 bits（192）	3e-39	110/119(92 %)	0/119(0 %)	正/正

```
Query  3      GAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTACAA  62
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||
Sbjct  772    GAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCAAAGACCTTGTGCTGTCTACAG  831

Query  63     TTACCTAATTGGAGGATATAGAATTATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGAGATTC  121
              ||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||  ||||||||||
Sbjct  832    TTACCTAATTGGAGGATATAGAATCACAGAATCATATAGAGAAGACG--ACAGAGATTC  888
```

美洲硬尾鸭（*Oxyura jamaicensis*，即红头鸭）SHBP4307 分离株，未定位基因组支架，编号 BPBGC_Ojam_1.0 oxyUn_random_OJ71826，序列编号 NW_023310710.1。

长度：10665　　比对次数：1　　范围 1:765 到 889

得分	期望值	一致性	差异性	链方向
154 bits（83）	3e-34	112/125(90 %)	6/125(4 %)	正/正

```
Query  3      GAGGATAGGTTGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCGAAGACCTTATGCTGTCTACAA  62
              |||||||||| |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  765    GAGGATAGGTGGTGACAGCTGACTCTGTTCAGCCTTGCAAAGACCTTATGCTGTCTACAG  824

Query  63     TTACCTAATTGGAGG-ATATAGAATT-----ATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGA  116
              || ||||||||||   ||||||| ||     ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  825    TTGCCTAATTGGAATCATATAGAGTTTCCTAATAGAATCATATAGAGAAGACGACACAGA  884

Query  117    GATTC 121
              |||||
Sbjct  885    GATTC 889
```

参 考 文 献

[1]Bognar L., Helik F., Izso T. Kasza G. Studies on adulteration of goose foie gras assessed in the years 2015 and 2016 in Hungary-case reports. European Poultry Science. 2018, 82 DOI: 10.1399/ eps.2018.237

[2]Gao G., Zhao X., Li Q., He C., Zhao W., Liu S., Ding J., Ye W., Wang J., Chen Y., Wang H., Li J., Luo Y., Su J., Huang Y., Liu Z., Dai R., Shi Y., Meng H., Wang Q.. Genome and metagenome analyses reveal adaptive evolution of the host and interaction with the gut microbiota in the goose. Sci Rep. 2016, 6 pp. 32961. doi: 10.1038/srep32961

[3]Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies.

[4]Pure and Appl. Chem. 1995, 67, pp. 331–343

[5]Guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods by means of a collaborative study. Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

[6]ISO/TS 16393, Molecular biomarker analysis — Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods

[7]Uhlig S., Frost K., Colson B., Simon K., Mäde D., Reiting R., Gowik P., Grohmann L. Validation of qualitative PCR methods on the basis of mathematical-statistical modelling of the probability of detection. Accred. Qual. Assur. 2015, 20, pp. 75–83

[8]National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at (accessed 2022-09-16):

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome